

⑫ 公表特許公報(A)

平5-502018

⑬ 公表 平成5年(1993)4月15日

⑭ Int. Cl.⁴
A 61 K 31/715
C 08 B 27/00

識別記号
ABD
P
Q
庁内整理番号
8314-4C
8615-4C
8815-4C

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 9(2)

(全 15 頁)

⑯ 発明の名称 免疫系活性化方法

⑰ 特 願 平2-513422
⑱ 出 願 平2(1990)9月5日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)3月8日
⑳ 国際出願 PCT/US90/05022
㉑ 国際公開番号 WO91/03248
㉒ 国際公開日 平3(1991)3月21日

優先権主張 ㉓ 1989年9月8日 ㉔ 米国(US) ㉕ 404,785

⑳ 発 明 者 ジヤマス, スバイロス アメリカ合衆国 マサチューセツ 02118 ボストン, コモンウェルズ アベニュー 173
㉑ 出 願 人 アルファ ベータ テクノロジ アメリカ合衆国 マサチューセツ 01606 ウォルセスター, ワン
ー, インコーポレイテッド イノベーション ドライブ
㉒ 代 理 人 弁護士 細田 芳徳
㉓ 指 定 国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF(広域特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, DK(広域特許), ES, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 個体の免疫応答を刺激するのに十分な量の修飾(modified)β-グルカンを含む組成物を個体に投与することからなる、個体の免疫系応答の誘起方法。
2. 個体が負傷しているか、免疫が低下しているか、あるいはタンパク質栄養不足の状態にあるものである請求の範囲第1項記載の方法。
3. 修飾(modified)β-グルカンが経口または経鼻口で吸入されるものである請求の範囲第1項記載の方法。
4. 修飾(modified)グルカンの投与の態様が、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与および腹腔内投与からなる群から選ばれる非経口の態様である請求の範囲第1項記載の方法。
5. 個体への修飾(modified)β-グルカンの投与量が、
(i) 成獣応答におけるリンパ球の増殖、(ii) 免疫作用におけるマクロファージ活性、(iii) コロニー形成因子の放出およびサイトカイン類の産生、(iv) 単球および好中球からのリゾチーム、ロイコトリエン産生、並びに、(v) 多形核白血球による貪食作用を刺激するのに十分なものである請求の範囲第1項記載の方法。

6. 個体への修飾(modified)β-グルカンの投与量が、体重1キログラムあたり約0.05〜1.0gのβ-グルカンである請求の範囲第1項記載の方法。
7. 修飾(modified)β-グルカンが野性型グルカンに対しより高いβ(1→6)/β(1→3)結合比を有するものである請求の範囲第1項記載の方法。
8. 修飾(modified)β-グルカンが0.40より大きい分子量を有するものである請求の範囲第1項記載の方法。
9. 修飾(modified)β-グルカンが分子量あたり5以上のグルカン単位を有するものである請求の範囲第1項記載の方法。
10. 修飾(modified)β-グルカンが *S. cerevisiae* の系統(strain)から由来するものである請求の範囲第1項記載の方法。
11. *S. cerevisiae* の系統(strain)が R4(WRL Y-15203)系統である請求の範囲第1項記載の方法。
12. 感染に対する宿主防御の改善に十分な量の修飾(modified)β-グルカンを含む組成物を個体に投与することからなる、負傷しているか、免疫が低下しているか、タンパク質栄養不足であるか、または老化している個体における免疫応答の誘起方法。

免疫系活性化方法

説明

背景

傷害、感染、および炎症性疾患に対する代謝応答は、傷害や感染の範囲と程度を制限し創傷治癒を促進すると考えられる様々な生理的変化で構成される〔ポンボセリ(J.J. Ponsoselli)ら、J. of Parenteral and Enteral Nutrition, **12**(2):212-218 (1988)〕。代謝応答は、開始現象の原因に対するあるいは生物に対する限定的刺激候を伴う一時的および短期的反応パターンを特徴とする。この反応の際にみられる生理的変化としては、末梢組織からのアミノ酸の異化増大とそれに引き続く肝タンパク質合成増大、血漿中における野中糖増多を伴う顕著な血糖増多、並びに血漿総蛋白量の可分率などが挙げられる。内分泌的変化の一部としては、血漿インシュリン、グルカゴン、およびグルココルチコイドの上昇などが挙げられる。発熱および食の消費平衡も傷害や感染に対する代謝応答の特徴である〔ポンボセリ(J.J. Ponsoselli)ら、J. of Parenteral and Enteral Nutrition, **12**(2):212-218 (1988)〕。

代謝応答は細胞媒介物質によって制御される。少数のこれらの細胞媒介物質としては、インターロイキン-1アルファおよびベータ(11-1)、腫瘍壊死因子アルファ/カケクチン

タンパク質栄養不足の者、貧血者、および免疫を損なわれた者は、栄養が十分に免疫が正常な患者にあっては免疫が白血球の関与する免疫細胞調節および炎症性防御機構を賦能する能力を強化するところの必要な代謝応答を感染や傷害に対して発揮する能力が実質的に失われている。栄養、タンパク質栄養不足は免疫反応の発生頻度と強度の増大と直接関連づけられている〔ホルズワース(Haldenar)ら、J. Theor Biol., **108**:119-133 (1984)〕。

新生動物栄養不足あるいは植物由来物質によって免疫細胞媒介物質の産生を刺激することによって感染を治療したり防止することが最近の関心の的となっている。例えば、酵母細胞壁グルカン(β-1,3)は哺乳動物における免疫系のいくつかの部分を刺激する能力を有する。この効果の機序が明らかにされており、末梢造血血球および血管外マクロファージ上に存在する特異的グルカン受容体が関与している〔クゾップ(Kozop)ら、Path. Immunopath. Res., **5**:286-290 (1985)〕。この受容体をグルカンで活性化すると造血防御の増強が観察されるが、これには主にマクロファージとマクロファージ由来免疫細胞によって媒介される一連の細胞作用が関与し、これによって患者の感染抵抗性が高まる。

酵母生物の細胞壁は、β(1-3)グルコース単位の糖鎖中にβ(1-6)結合による短い度合いの分子間および分子内分枝がけいたものから成る多糖鎖であるβ-結合グルカンから主として成る。主には高炭分枝β(1-6)グルカンから成るマイナーな成分が炭成分と密接に関連しており、両者が

13. 菌体(modified)β-グルカンが感染源、注射剤、または静脈内点滴として投与される請求の範囲第1項記載の方法。

14. 菌体の免疫応答を強化するのに十分な量の菌体(modified)β-グルカンを溶液中に希釈し投与することからなる、二次的感染の危険性を有する菌体の二次的感染の防止方法。

15. 菌体が切迫した手術に直面しているものである請求の範囲第14項記載の方法。

16. 菌体が化学療法または放射線療法を受けているか、受けようとしているものである請求の範囲第14項記載の方法。

17. 菌体が腎臓透析、腹膜透析または血漿透析を受けているものである請求の範囲第14項記載の方法。

18. 菌体が免疫の低下する状態に罹患したものである請求の範囲第14項記載の方法。

19. 菌体が免疫を損なわれているものである請求の範囲第14項記載の方法。

20. 菌体がタンパク質栄養不足である請求の範囲第14項記載の方法。

ン(125F)、腫瘍壊死因子ベータ/リントキシン、コロニー刺激因子(CSF)、血小版由来成長因子(PDGF)、およびガンマインターフェロンなどが挙げられる。これらの媒介物質すなわセノカインは、単独食物源と呼ばれる菌体によって宿主の傷害や感染に反応して分泌される。

免疫防御機構に關与する主な免疫媒介物質はインホカインのインターロイキン-1(11-1)であり、このものは単核細胞によって合成される。様々な細胞免疫における感染に対する非特異的抵抗を強化するために11-1を使う菌体の研究がけられてきた〔ポンボセリ(Ponsoselli)ら、J. Parent. Ent. Nutr., **12**(2):212-218 (1988)〕。11-1およびその他の細胞媒介物質のヒトにおける使用に關連する主な問題は、免疫制御ネットワークの微妙なバランスが破られる結果生じるという毒性および副作用である〔フェウ(Feu)ら、Agg. of Internal Medicine, **108**:421-433 (1987)〕。したがって、セノカインの抽出を制限することによってそれらの内因的効果を模倣する方がセノカインを外科的に投与するよりも合理的、生理的、かつ効果的であろう。

免疫を損なわれた者、例えば化学療法や放射線療法の患者、エイズなどの免疫不全症の患者や障害をもつ患者、あるいは腫瘍も組織上の損傷、術後合併症やその他の合併症の危険性が高い患者の大きな1群を構成している。これらの合併症は炎症や手術に起因する二次的感染が主な原因であり、患者の罹患率および死亡率の面で重大な意味がある。

一般になつてアルカリ不溶性グルカン部分を構成している。

β -グルカンの構造および/または製法については、マナーズ (Manners) の [Biochem. J., 105:71-80 (1973)]、シエツマ (Sietzma) の [J. of General Microbiology, 31:4:93-102 (1979)]、コベッカ (Koeche) の [J. of Cell Biology, 52:66-76 (1974)]、クレガー (Kreger) の [J. of General Microbiology, 32:202-220 (1975)]、およびジルクワ (Diluzio) の [Int. J. of Cancer, 24:713-730 (1979)] によつて述べられている。ホスホリル化グルカンを治療目的に使用することが米国特許第4,739,046号でジルクワ (Diluzio) によつて、および米国特許第4,761,402号でウィリアムス (Williams) によつて述べられている。

発明の要旨

本発明は、天然および既存の市販グルカン製剤を包含する既知グルカンと比べて有意に強化された免疫増進性を有する一群の修飾グルカン（糖質）を特許して特許権における免疫応答を刺激する方法に関するものである。天然原料と比較して高い $\beta(1-3)$ / $\beta(1-6)$ グリコシド結合比を有する修飾グルカン製剤は、強化されたイン・ビトロおよびイン・ビボのマクロファージ活性化特性を有する。本方法は、免疫を損なわれているか、あるいは、単独あるいはその他の医学的範囲による感染の危険に曝されている宿主（動物また

はヒト）における免疫応答の賦活化に特に有効である。本発明の方法は、個体の免疫応答を賦活化するとともにその個体の宿主防御の改善に必要な一連の現象を誘導するのに十分な量の修飾グルカン(modified glucans)をその宿主に投与するものである。

本方法で用いられる修飾グルカン(modified glucans)は、天然（未修飾）グルカンより高い $\beta(1-3)$ / $\beta(1-6)$ 結合比を有する修飾された酵母由来炭水化物ポリマーである。本方法で用いられるグルカンは、それらまたはそれらを産生する生物（例えば酵母細胞）を培養することによつて、精造中の $\beta(1-3)$ / $\beta(1-6)$ 結合比を上げるべく修飾される。修飾 β -グルカンは、今日までに報告されている天然の細菌グルカン、植物グルカン、および真菌グルカンや、サイモサン (Synosan, Synge Chemical Co., St. Louis, MO) やグルカン-P (Glucan-P, Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, CT) などの野生型酵母細胞培養物とは、該修飾グルカンの一次構造が野生型製剤より高度の分枝（すなわち $\beta(1-3)$ 結合がより多い）を有するという点で構造的および機能的に異なる。このより高レベルの分枝は、より拡張した立体配座と、より上昇した水合溶液中溶解度を修飾グルカンに与える。例えば、修飾グルカンの水溶液は野生型グルカンより大きい水動容積 (hydrodynamic volume) を有する。修飾グルカンのもつて強化された構造と立体配座が示す最も有意な影響は、サイモサン食食作用の結合時阻害により測定した場合、野生型グルカン製剤より約15

倍大きい親和性で単独マクロファージの β -グルカン受容体と結合し活性化する能力である。

修飾グルカンは天然物であり、精製されたり化学的に修飾されていない。すなわち、天然グルカン上には存在しないいかなる官能基をも含んでいない。したがって、修飾グルカン製剤を利用した本方法は、宿主物の侵入と感染に対する抵抗性を強化するためにヒトおよび動物に安全かつ効果的に投与する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、 $\beta(1-3)$ 結合割合と単一の $\beta(1-6)$ 結合分枝分子を示すグルカンポリマー中の一般的な繰り返し単位の概略図である。

図2は、精製 $\beta(1-3)$ 結合グルカンの ^{13}C -NMR スペクトルである。

図3は、可溶性修飾グルカンの ^{13}C -NMR スペクトルを天然の直鎖状グルカンおよび分枝グルカンの ^{13}C -NMR スペクトルと比較したものである。

図4は、 $\beta(1-3)$ 結合割合と $\beta(1-6)$ 結合割合を示す修飾グルカン分子の概略図である。

図5は、グルカン製剤を投与する単独のマウスによって決定したヒト胚芽中における食食能力の刺激のレベルを様々なグルカン製剤と比較したグラフである。

図6は、サイモサン、*S. cerevisiae* R4由来の修飾グルカン粒子、および *S. cerevisiae* A364A 由来の修飾グルカン

粒子によるヒト胚芽中のロイコトリエン B₄ (LTB₄) の合成の誘導を示すグラフである。

図7は、*S. cerevisiae* R4由来の修飾グルカン粒子、およびグルカン-Pによるマウス胚芽中の TGF の誘導を示すグラフである。

図8は、*S. cerevisiae* R4由来の修飾グルカン、および酵母抽出物 (YE) グルカンによる単独のマウスのサイモサン阻害に及ぼす用量依存的阻害効果を示すグラフである。

図9は、修飾グルカンの単独投与 (5 mg / マウス) 後のマウスにおける末梢血の全白血球数および分画白血球数の変化を示すグラフである。

図10は、修飾グルカンの頭回皮下投与 (5 mg / マウス / 回 x 4 回) 後のマウスにおける末梢血の全白血球数および分画白血球数の変化を示すグラフである。

図11は、マウスにおける *E. coli* 感染モデルにおける修飾グルカンの有効性を示すグラフである。

図12は、 6.75×10^6 を照射したマウスにおける造血増殖に及ぼす *S. cerevisiae* R4由来修飾グルカンおよびグルカン-Pの影響を比較したグラフである。

図13は、 8.5×10^6 を照射したマウスの30日生存率に及ぼす修飾グルカン投与の影響を示すグラフである。

図14は、 7.5×10^6 を照射したマウスにおける内臓性腫瘍コロニー形成率 (B-C 群) の刺激に及ぼす修飾グルカンまたはグルカン-Pの単回投与の影響を示すグ

ラフである。

発明の詳細な説明

本方法において有用な多糖 β -グルカンには、細菌、植物、および菌類に由来する天然多糖型グルカンに併してより高い β (1-6) / β (1-3) 結合比を有する α -グルカンである。本発明のグルカン（以下「多糖 β -グルカン」または「多糖グルカン」という）は天然グルカンよりマクロファージ活性化特性が向上されているので、より強力な免疫応答活性化をもたらす。多糖 β -グルカンは酵母細胞などのグルカン含有細胞の細胞壁に由来するものであり、グルカン糖基中に存在する β (1-6) 分枝の濃度を上昇させるべく改造されたものである。

免疫調整特性 (immunomodulating properties) を有するグルカンポリマーはいずれも共通の β (1-3) 結合基環状グルコース骨格を有する。レンチナンやスクレログルカン (chitinoglycan) など多くの糖類も骨格中にグルコース単位位のC-6炭素原子から幾何学的に分かれた分枝を含んでいる。図1は、免疫調整特性を有する複数のグルカン、およびそれらの報告例の一般的結合構造をまとめたものである。

原子の化学シフト (シグナル) は、対応する未結合炭素と比べて平均的に大きくシフトされる (9 ppm まで)。図2は、環状 β (1-3) 結合グルカンポリマーについて観察されたものとしてこの現象を説明している。スペクトルは、 β (1-3) 結合グルコース単位の5個の炭素原子から得られた6つのシグナルを示している。矢印 (1' と 2') はD-グルコースの場合のC-1およびC-3シグナルの位置を示しており、 β (1-3) グリコシド結合に関与する炭素原子C-1とC-3について起きるシフトを説明している。表1に挙げたグルカンを除いた広範なNMR研究が実施されており、これらをそれらの構造を比較する上で有用な手段にしている。

多糖グルカンの構造の推定は、それらの ^{13}C -NMRスペクトルで明白に説明することができる。図3は、「多糖 β -グルカン」の ^{13}C -NMRスペクトルを示すと同時に健康の免疫活性を有するグルカンについて報告されている ^{13}C シグナルの位置をまとめたものである (表1参照)。表1に挙げたグルカンはいずれも、 β (1-3) 結合グルコース部分の5個の炭素シグナルを共有している。第2に、すべての糖類の分枝グルカン (例えばレンチナン、スクレログルカン、スネグロフィラン) はいずれも、図3に影ボックスとして示した特徴的シグナルを約7.9 ppmの位置にもたらす。このシグナルは、分枝点の位置で図3中C-6'として示したC-6原子 (3, 6- β -D-置換C-6) を減しており、 β (1-3) グリコシド結合に関与しているがゆえに、8.1 ppm

表1

免疫活性を有するグルカン

グルカン	起源	結合
カードラン	<u>Ustilago</u> <u>sp.</u>	β (1-3)
可溶性リン酸化グルカン	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> <u>Coffea</u> <u>arabica</u>	β (1-3)
アミノ化グルカン	<u>Fungi</u> , <u>bacteria</u> , <u>lichen</u>	β (1-3)
アルカリ不溶性酵母グルカン	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	β (1-3) / β (1-6)
レンチナン	<u>Lentinus</u> <u>edodes</u>	β (1-3) / β (1-6)
スクレログルカン	<u>Sclerotium</u> <u>glucan</u>	β (1-3) / β (1-6)
スネグロフィラン	<u>Sclerophylla</u> <u>glucan</u>	β (1-3) / β (1-6)

原料の糖類 (例えば生物) に関わらず、表1に挙げた分枝グルカンはいずれも、図1に示したように β (1-6) 結合によって骨格と結合している分枝の位置に単一のグルコース単位を含んでいる。

グルカン中の結合タイプと構造を決定する際の一般的な手段は、炭素13核磁気共鳴スペクトル分析 (13C-NMR) である。得られたスペクトル中の13Cシグナルの数と相対強度を用いてグルカンポリマー中の結合配置と位置を決定することができる。例えば、グリコシド結合に関与している炭素

の位置にあるC-6シグナルに対して相対的に位置づけられている。

多糖グルカンは、さらに約8.9 ppmの位置にも顕著なシグナル (白ボックス、図4ではC-6'として示している) を含んでおり、これは分枝の内部 β (1-6) 結合グルコース部分を示し、複数のグルコース単位を有する分枝の存在を説明している。表2は、表1のグルカンについて報告されている相対パラメータを多糖グルカンのそれらと比較したものである。

表 2

グルカンの分枝・結合構造

グルカン	分枝頻度 ¹	分枝あたりのグルコース単位数	$\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合比
カドラン	0	0	0
可溶性リン酸化グルカン	0	0	0
アルカリ不溶性酵母グルカン ²	0.03(1/33)	1	0. 0 3
スクレオグルカン	0.33(1/3)	1	0. 3 3
スキゾフィラン	0.33(1/3)	1	0. 3 3
レンチナン	0.40(2/5)	1	0. 4 0
酵母グルカン ²	0.50(1/2)	2	1. 0 0

1 分枝頻度=分枝数/減り遅し単位あたりのグルコース単位数

2 Nannars et al., *Biochemical Journal*, 135 19-30 (1978).

3 ジェマス (S. James) からの米国特許出願第 07/333,630 における *S. cerevisiae* R4 からの菌株

したがって、免疫活性を向上させた半純度の酵母グルカンは、酵母の既製の天然グルカンより高くした $\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合比と 1 個以上のグルコース単位を含む分枝とを有するものとして特徴づけられる。

本方法において有用な酵母グルカンは、ジェマス (James) によって米国特許第 4, 810, 646 号、1989 年 4 月 15 日出願の同時係属中の米国特許出願第 7/333, 630 号、およびいずれも 1980 年 1 月 17 日出願の 4

性を有する。さらに詳しくは、マクロファージ活性化特性はグルカン分子上に存在する $\beta(1-6)$ 分枝の頻度とタイプに関連するということがわかっている。例えば、突然変異体酵母菌株 *S. cerevisiae* R4 に由来する酵母グルカンは、表 2 に示したように野生型 β -グルカンより有意に多くの $\beta(1-6)$ 分枝を有し、野生型および非酵母グルカン製剤よりも強力かつ顕著な免疫応答を誘発する。

「天然グルカン」とおよび「非天然グルカン」という用語は、グルカンポリマーそのものあるいはそれを製造する生物（例えば細菌、酵母菌）がそのグルカンの構造、特に $\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合の比率を変化させるべく処理されたり修飾されたりしていないグルカンおよびグルカン製剤を含む意味を有する。天然および非天然グルカンとしては、例えばサイモサン、レンチナン、およびグルカナーゼなど既知の酵母製剤が含まれる。

特定のグルカン製剤の免疫性あるいは効率は、主にそれが認識され吸収される β -グルカン受容体に結合する能力に依存するのである。 $\beta(1-6)$ を多くした酵母グルカンは、ヒト単球および好中球のグルカン受容体に対する親和性が増大している。酵母グルカンのこのような増大した生物活性は、製剤方法あるいはポリマーの性質すなわち分子構造であるか可溶性であるかに関わらず保存される。

本願において用いるところ、「酵母 β -グルカン」とおよび「酵母グルカン」という用語は本発明 β -グルカンの生物学的に許容される類似体を含むものとして理解されるべき

2/297, 332 号と 07/297, 752 号で、またジェマス (S. James) によって *Biotechnology and Bioengineering*, 22:769-784 (1980) で述べられているようにして調製された酵母グルカンであり、これらすべてが記載する内容は参照することにより本願に含まれる。表 2 に示したように、酵母グルカンは 0. 40 より大きい $\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合比と分枝頻度を有する。

どの系統の酵母から得られる酵母 β -グルカンでも用いることができるが、*S. cerevisiae* が好ましい系統である。酵母 β -グルカンは、例えば *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Hansenula winei*, *Hansenula arzi*, *Hansenula heuvelii* および *Hansenula americana* など他の系統の酵母から製造してもよい。

本方法において特に有用な酵母 β -グルカンは、ジェマス (S. James) によって *Biotechnology and Bioengineering*, 22:769-784 (1980) および同時係属中の米国特許出願第 07/333, 630 号に述べられている突然変異体系統の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* R4 (NRRL Y-15903) に由来する高純度 β -グルカンである。これらの酵母グルカンは、天然および非天然グルカン製剤と比べて強化されたイン・ビトロおよびイン・ビボのマクロファージ活性化特

である。「既知」という用語は、酵母 β -グルカンと同じ生物学的効果を示す化学的に関連のある構造体を含む。

本発明は具体的に、酵母 β -グルカンまたはその誘導体を含有する組成物の経口または経腸経路により動物（ヒト）に与える免疫系を刺激する方法を指すものである。本方法は、例えば貧血したり、免疫が弱なわたり、あるいはタンパク質栄養不良の状態にある動物あるいは患者の免疫応答を向上させる上で効果的である。免疫が弱なわたり、例えばウイルス、細菌、真菌、および寄生虫などの感染性病原体による疾患に対する正常な免疫性あるいは免疫防御を有する能力が低下あるいは減少している者であると一般に定義される。タンパク質栄養不良の動物とは、デシリットルあたり (g/dl) 約 8. 2 グラム未満の血清アルブミンレベルおよび/または通常の体重の 10% を超える非意図的体重減少を有する者であると一般に定義される。

より詳しくは、本発明の方法は、平衡、傷害、疾病、虚脱、減量または化学療法、あるいはその他の免疫系に悪影響を及ぼす状態に陥る動物の免疫性が低下している動物またはヒトを治療的あるいは予防的に処置するために用いることができる。本方法は、HIV 感染（エイズ）など免疫系が低下した動物または患者の免疫系を低下または抑制させる疾患あるいは状態を有する動物の治療に有用である。例えば、本方法は化学療法または放射線療法を受けている動物の免疫系に対する正常な代謝

応答を最適化(mobilise)させる能力の低下をもたらす感染、障害、あるいは治療(treatment)ゆえの二次的感染や新感染併発の発現の危険性が高くなっている患者における代謝免疫応答をあらかじめ開始させるために用いることができる。修飾グルカン製剤による治療は、宿主の異常な免疫防御を最適化させることで免疫寛容(treated host)における感染からの保護の応答性を強化する上で特に有効であることが示されている。

本方法にさいては、修飾グルカンは患者に投与され、その結果、主にマクロファージおよびマクロファージ由来産生物によって媒介される一連の相互作用を伴う宿主防御の増強をもたらす。これらに関連可能な応答の一部としては、食細胞活性、炎症因子(ロイコトリエン)の放出、リゾチーム酵素の放出、インターロイキン-1、4、および6の放出、コロニー形成因子の放出、止血増強、腫瘍壊死因子(TNF)の放出、および抗原提示(antigen presentation)の強化が挙げられる。

本発明の一つの態様において、免疫系異体原系系統 *S. cerevisiae* R4から派生された修飾グルカン粒子について、上記応答を活性化する能力を測定した。これらの修飾製剤は、下記のグルカン物質と比べて有意に強化された生物活性を示した。マラーズ(Manners)らの著書「*Biochem. J.*, 135, 19-26 (1979)」に拠って調製したアルカリ不溶酵母修飾野生型グルカン、市販の酵母沈降母細胞懸液製剤であるザイモサン(Sigma Chemical Co.)、および *S. cerevisiae* R4の懸液系で

ある *S. cerevisiae* A304A (米国特許第4, 810, 645号)に由来したR4製剤より低い $\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合比を有する非修飾全グルカン粒子。図5に示した結果は、ヒト血球における食作用を誘導する修飾グルカンの増加効果を示す。強化された食作用は、1細胞あたり3個以上のグルカン粒子を摂取した細胞の百分率で表される。*S. cerevisiae* R4に由来する修飾グルカン粒子は、グルカンを摂取した細胞の合計数および1つの細胞毎に摂取されたグルカン粒子の合計数の双方の点からみて強化された食作用利便を示した。他のグルカン製剤より有意に高い $\beta(1-6)/\beta(1-3)$ 結合比を有しているR4グルカン製剤の修飾組成はより大きなグルカン受容体親和性を有し、より高い反応性をもたらしている。

別の態様において、好中球について、様々なグルカン製剤とともに低濃度した際の炎症反応誘発ロイコトリエンB₄ (LTB₄)の産生を測定した。図6に示したように、修飾R4グルカン製剤(WGP-R4)は、*S. cerevisiae* A304A由来のグルカン粒子(WGP-A304A)より高レベルであってザイモサンより実質的に高いレベルのLTB₄生成を誘導した。これらの結果は、*S. cerevisiae* R4に由来する修飾グルカンは、非修飾型グルカンと比較すると単体のグルカン受容体に対する親和性が增大していることを示すものである。

もう一つの態様において、R4修飾グルカンの水溶液製剤を、本願と同時に出版された(代理人の事件番号A BY 88

003)同時係属中の米国特許出願第_____号でジャマ(James)らによって述べられているプロセスを用いて修飾酵母水分精によって調製したが、その費収するところのものは参照することにより本願に包含される。この可溶性製剤のグルカン受容体に対する親和性を、それがグルカン受容体を競合的に含容しその培養ザイモサン粒子の取り込みを阻害する能力を測定することによって測定した。低限の50%の阻害を得るのに要する可溶性グルカンの濃度を測定した。さらには、可溶性修飾グルカン製剤およびその他の天然可溶性グルカンの受容体親和性のデータをまとめたものである。

表 3

多糖	50 %阻害濃度 (ng/ml)	液相親和性
大渡多-グルカン ¹	8.5	1
ラミナリン(藻類) ¹	3.2	2
イースト抽出 グルカン	2.5	1.9
非修飾グルカン(A304A)	1.5	4.3
修飾グルカン(R4)	0.1	55.0

¹ Clegg and Austen, *Journal of Immunology*, 135:3288-3293 (1985)

² Jones et al., *Journal of Immunology*, 137: 3270-3276 (1986)

本発明の修飾グルカン組成物は、予防処置として手術、化学療法、あるいはその他の悪性疾患の治療に際す患者の例えは72時間前までに投与することができる。修飾グルカン製剤は、上記現象の後に、免疫反応の悪化の場合は例えは72時間までの期間、化学療法の弊に起因するような慢性免疫抑制状態にある患者に対してはさらに長い期間にわたり投与してもよい。この処置により、患者の非特異性および特異性宿主防御が修飾β-グルカン製剤によって刺激されて内在性媒介物質(例えばIL-1, TNF)が放出しそれらが一連の代謝現象を媒介するのであるが、その代謝現象としては抗原に反応する形でのリンパ球産生の増強、食作用におけるマクロファージ活性、コロニー形成因子の放出、および抗原と好中球からのリゾチームとロイコトリエンの産生の増大が含まれる。

これらの代謝機能は、術後合併症に関連する二次的感染に対処する際、および化学療法、放射線療法、腎不全、エイズ、およびその他の障害に関連する免疫応答抑制状態を改善させる際に積極的に役に立つ。したがって、長期にわたる治療が望まれていたりタンパク質栄養不足の患者は十分な免疫性防御および細胞性免疫を行うことができ、二次的感染に対する生存率が向上する。

修飾β-グルカンの誘導はいくつかの理由によりIL-1やコロニー形成因子などのサイトカインの直接的誘発とより有利である。サイトカインは逆に細胞内通信手段によって製造されるが、精製が困難で高価かつ、著しい毒性

と強い副作用をもたらす。修飾グルカン製剤の投与は、臨時的な細胞媒介物質の肉因性飲量をバランスのとれた比率で制御する。

本発明の方法において投与される組成物は、修飾グルカン以外の他の成分を任意に含むことができる。特定の組成物に含まれる他の成分は、主にその組成物の投与の仕方によって決定される。例えば、液剤の形で経口的に投与される組成物は、修飾グルカン以外にも充填剤（例えば乳糖）、結合剤（例えばカルボキシメチルセルロース、アラビアガム、ゼラチン）、アジエバン、着色剤、香味剤、およびコーティング剤（例えばワックスまたは可塑剤）を含むことができる。液剤の形で投与される組成物は、全グルカン、および延遲に乳化した、凍結剤および/または着色剤を含むことができる。経口投与用組成物は、水、緩衝液、PBS、デキストロース、あるいはその他の生物学的に許容される媒体中に混合、溶解、または乳化することができる。

修飾グルカン製剤の投与の経路は、経口、鼻、非経口、筋内、皮下、腹腔内、筋肉内、箇所、または腹腔内とすることができる。組成物を投与する形態（例えば粉末、液剤、カプセル、溶液、乳液）はそれを投与する経路に依存するであろう。投与する組成物の量は個体ごとに決められ、少なくとも一部は患者内の感染または傷害の程度、患者の状態あるいは全体の健康状態、患者の体重および手術前あるいは術後の状態、化学療法またはその他の高リスク処置を考慮した上で決められるであろう。一般に、単回投与では、体重1キログラムあ

たり約0.001ないし約200.00mgの修飾グルカンを含むことが好ましいであろう。

一般に、本発明の組成物は、個体の免疫応答を刺激するために必要に応じて定期的にその個体に投与することができる。医療分野に習熟した者であれば、患者の健康状態と検査結果の履歴や検査に応じて組成物の投与期間と用量を決めることができるであろう。上記の通り、該組成物は、感染に対して主体が易感化させる正常な代謝防御をあらかじめ開始させるための予防処置として用いてもよい。

免疫応答の向上をもたらす修飾グルカンを利用する本方法は、細菌の免疫系を治療的にあるいは予防的に易感化させる上で特に有効である。

下記の実施例によって本発明をさらに詳しく説明するが、これら実施例はいかなる意味においても本発明を限定するものではない。

要約

実施例1

ヒト単球による免疫応答の活性化

下記のグルカン製剤につき、ヒト単球における免疫応答を誘導する能力を試験した。

(1) サイエタン (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) - 市販の修飾グルカン製剤。

(2) アルカリ不溶性グルカン-マナーズ (Manners) の手順「Biochem. J., 133:19-30 (1979)」に従いパン酵母から調製したもの。

(3) WGP-R4 (Jamas) によって米国特許第4,810,648号で述べられている方法に従い Saccharomyces cerevisiae A364Aから調製した全グルカン抽出物。

(4) WGP-R4 - Saccharomyces cerevisiae 84 (米国特許第4,810,648号および同時係属中の米国特許出願第07/318,634号) から調製した全グルカン抽出物。

これらの製剤を細胞に対する殺菌の比較のないときにそれぞれ対応する 5×10^4 /ml ないし 5×10^6 /ml (0.01mg/ml ないし 0.3mg/ml) のグルカン値子濃度で付着性 (adherent) ヒト単球とともに37°Cで保温した。少なくとも300個の単球によって採取されたグルカン値子の数を 1000 倍の光学顕微鏡を用いる直接観察によって測定した。図5に示した結果は、細胞1個あたり1個以上 (≥3) のグルカン値子を採取した細胞の百分率として表されている。免疫反応は系統R4由来の全グルカン抽出物 (WGP-R4) は、グルカンを採取した単球の合計数および1つの単球あたり採取されたグルカン値子の合計数の両方の点からみて免疫作用の刺激を強化した。

実施例2

修飾グルカンによるマクロファージ分泌活性の刺激強化

3mg/mlヘキサース当量のグルカン製剤とともに37°Cで45分保温した際のヒト単球につき、炎症媒介物質ロイコトリエンB₄ (LTB₄) の産量を測定した。LTB₄ 産量は、クジップとオーステン (Cripp and Austen) の手順 [Cripp and Austen, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:2751-2755 (1985)] に従い放射免疫測定 (RIA) によって測定した。修飾グルカンWGP-R4は、他のいかなる試験グルカン製剤より著しく高いレベルのLTB₄ を誘導した。結果を図6に示す。

グルカン製剤WGP-R4、およびパン酵母由来の殺菌性グルカン-P (Glucan-P, Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, CT) により活性化した際のヒト単球につき、炎症媒介因子 (TNF) の産量を測定した。精製単核細胞製剤から採取したヒト単球を、10、および50μg/mlのグルカン製剤とともに保温した。単球上清と細胞を3回凍結融解し、超高速遠心し、ミラーグラジアノ (Miller-Graziano) によって The Innate Consequences of Trauma, Shock and Sepsis に述べられているように β2ミューン 結合組織および細胞膜糖タンパク質を用いてTNFを測定した。図7に示した結果はTNFの合計産量（すなわち分泌されたTNFと細胞内TNF）を表す。

図7に示したように、修飾グルカンWGP-R4は、TNF産生によって測定して単球を活性化する能力が大幅に強化されている。

実施例 3

単離 β -グルカン受容体に対する修飾グルカンの親和性

グルカン分子が認識され単離の β -グルカン受容体に結合する能力はそれらの生物学的機能に不可欠である。突然変異体系統R4由来の修飾グルカン(WGP-R4)は、パン酵母由来の天然グルカンと比較して単離のグルカン受容体に対する親和性の増大を示した[ジャマス(Jamas)ら、J. Biol. Chem., **257**:3270-3278 (1982)]。

WGP-R4の合成は修飾グルカン製剤を、本願と同時に出版され(代理人の事件番号A51589-03)かつ参照として本願に含まれる同等発明中の米国特許出願第____号でジャマス(Jamas)らによって述べられているプロセスを用いて調製した。ヒト胎盤を様々な濃度の可溶性グルカンとともに15分間保温し、洗浄して未結合グルカンを除去した後、サイモサンとともに30分間保温した。單層を固定および染色した後、サイモサンを採取した單層の百分率を決定した。 β -グルカン受容体に対するグルカン製剤の親和性を、それらが競合的に受容体を占めることによって阻害されるサイモサンの取り込みを阻害する能力によって測定した。サイモサン阻害の50%阻害を得るのに要したグルカンの濃度を調べることによって試料を比較した。

受容体に対する修飾グルカンWGP-R4の親和性が有意に強化されたことは、サイモサン阻害の50%阻害を得るの

に要した濃度が低かったことから明白である。図8に示した結果は、修飾グルカンWGP-R4はパン酵母由来の天然グルカン(8, 5 μ g/ml) (YGグルカン)よりはるかに高い親和性(0, 1 μ g/ml)で修飾 β -グルカン受容体に結合することを証明しており、倍率が3.5倍と算出したことを示す。

実施例 4

修飾グルカンのイン・ビトロ評価

修飾グルカンのイン・ビトロ評価が末梢血白血球(WBC)数に及ぼす影響をマウスで評価づけた。R4系統由来の修飾グルカンの可溶性製剤を雄性C57BL/6マウスに静脈内(5V)および皮下(SC)投与し、合併血球数および分画血球数(differential cell counts)を規則的時間間隔でモニターした。

特に組織IV投与後に合計WBC数に大きな増大がみられた。図8と図10に結果をまとめたが、合計WBC数の急激な(くも時間)増大があって、最も大きな増大(1.2Xおよび6K)はそれぞれ単球数および顆粒球数で起きたことを示している。これに、ヒト胎盤上で高親和性 β -グルカン受容体が存在することを示唆するイン・ビトロのデータと一致する。期間長とSC投与(図10)は、48時間前から始まって油断開始後1:4時間目にピークに達した合計WBCの増大を誘発した。合計数の増大は、この期間における末梢血血

修飾グルカンの免疫効果の強化

免疫的となる可能性のある症候群照射の24時間前に、33 schonberger, 1986 24 から単離されたグルカン粒子(WGP-R4)およびグルカン-P (Glucan-P, Accurate Chemicals and Scientific Corporation) をマウスに皮下IV投与(5mg)によって投与した。これらの条件下では、対照の鼠水を投与されたマウスは放射線で誘発された骨髄抑制に起因する免疫機能低下で死亡した。これらのグルカンが免疫増強と回復の刺激に及ぼした影響は平均腫瘍重量の増加に反映された。図12は、修飾グルカンによってより高価の増大を引き起こされたことを示す。この増大は、グルカン-P誘発の生存率が70%であったのに対して修飾グルカン(WGP-R4)を投与された群は88%の生存率であったことを示す図13の30日生存率データによって裏付けられる。

R4系統由来の修飾グルカンのもう強化された特徴は、脾臓のグルカンの可溶性製剤でもみられた。脾臓の細胞系群に単回IV注射(5mg/マウス)によりR4系統由来の可溶性修飾グルカンをマウスに投与した。内在性脾臓コロニー形成単位(CFU)を計数することによって脾臓細胞の増殖と回復を測定した。図14に示した通り、修飾可溶性グルカンは脾臓(パッチェンとマックビルチー(Patchen and MacVillie), J. Biol. Resp. Mod., 1986)の可溶性製剤であるパン酵母由来グルカン-Pと比べて有意に高いレベルの速血細胞増殖をもたらした。

実施例 5

免疫モデル

免疫学的に評価の増進を脾臓手術後によく局するような免疫刺激から保護する上での修飾グルカンの有効性を評価づけるために、マウスにおける敗血症モデルを作製した。

モデルは、修飾グルカンのIV投与24時間後に、腹腔腔的心臓穿刺を用いる単回注射(single bolus injection)によって、1mlのE. coli 系統TVDL-ラット懸濁液(約 10^8 CFU/ml)をマウスに腹腔腔内投与投与する方式を用いた。マウスをケージに戻し、飼料と水を自由に(ad libitum)摂取させた。10匹のマウスから成る対照群には、修飾グルカン投与時に0, 1mlの単回食塩水を注射した。処置群と食塩水対照群について、投与後48時間後の死亡率を記録した。図13に示した結果は、修飾グルカンは0, 0.1mg/マウス(0, 5mg/kg体重)という低い用量で食塩水対照群と比較して死亡率を有意に低下させた($p < 0.05$)ことを示している。

実施例 6

化合物

当業者は、通常の実験を用いるだけで、本願中に述べられている特定の材料および成分と同等である多くの物質を認識するか、または推定し得るであろう。このような化合物は下記請求項の範囲に含まれるものとする。

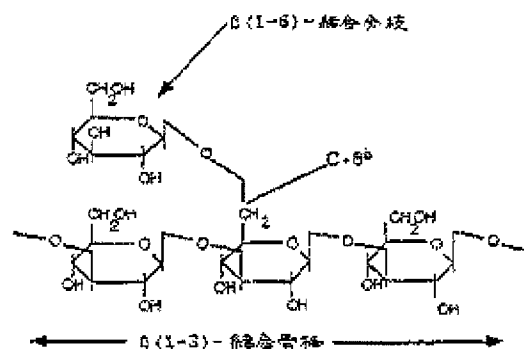


図 1

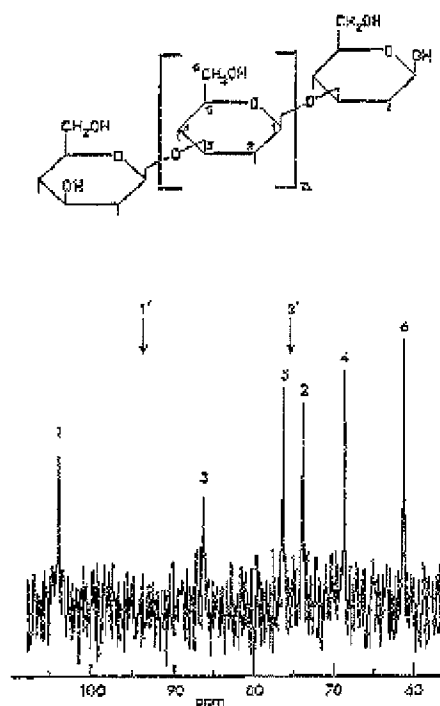


図 2

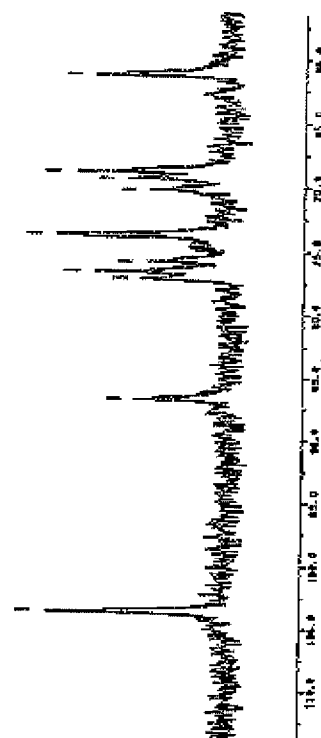


図 3

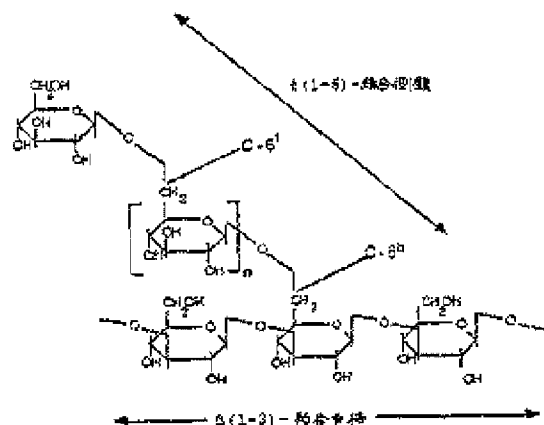


図 4

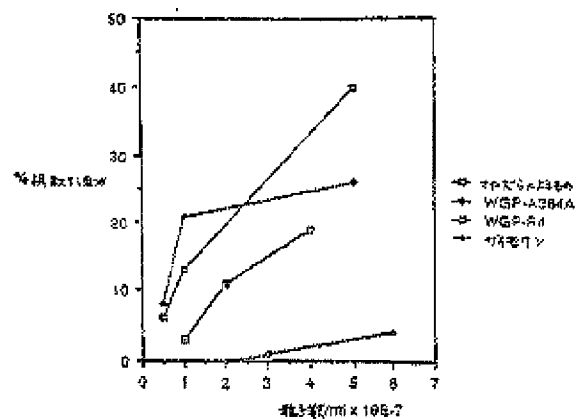


図 5

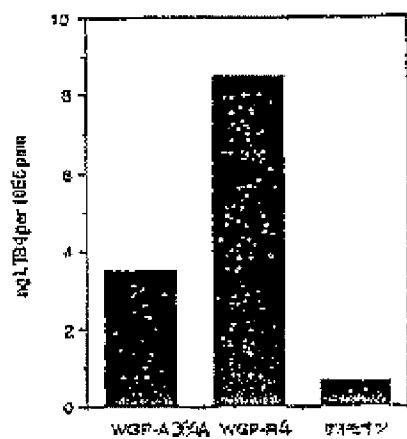


図 6

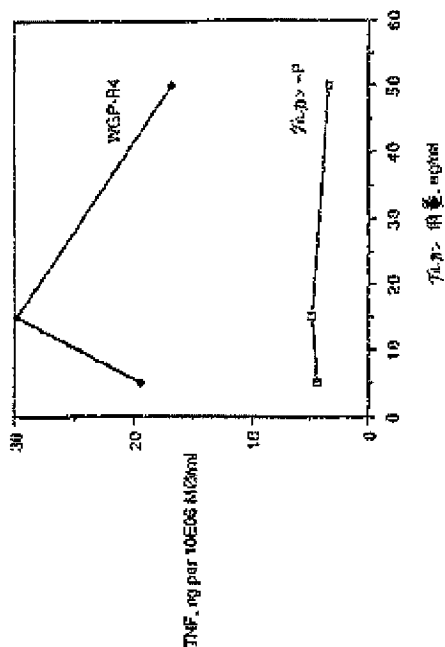


図 7

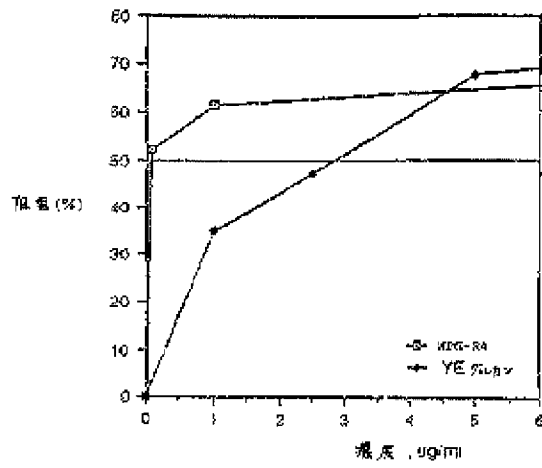


图 8

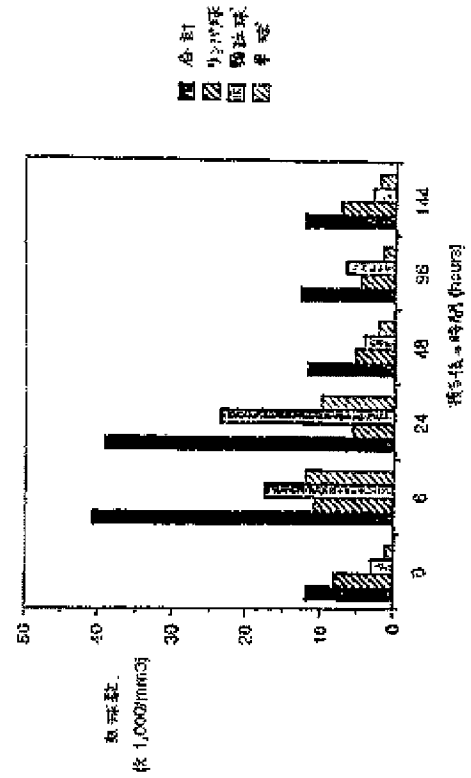


图 9

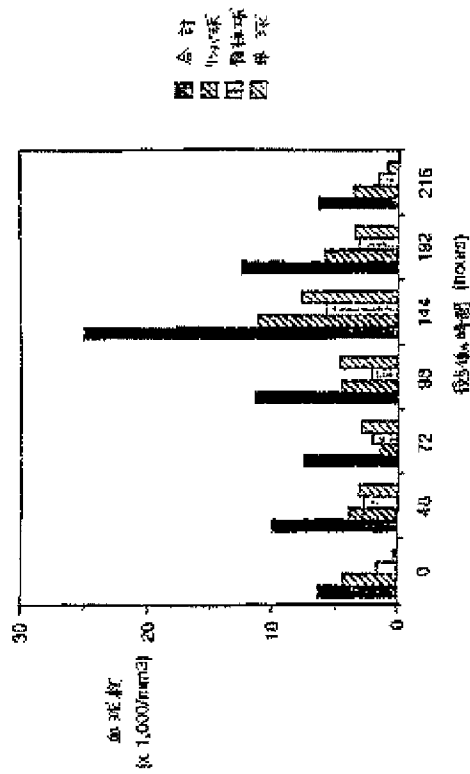


图 10

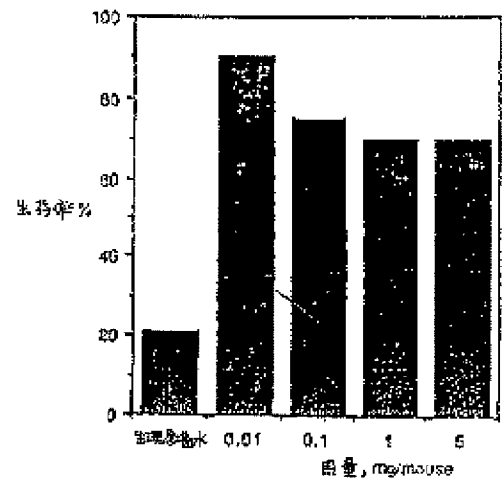


图 11

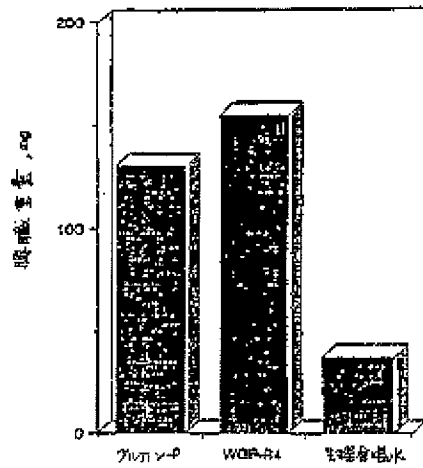


図 12

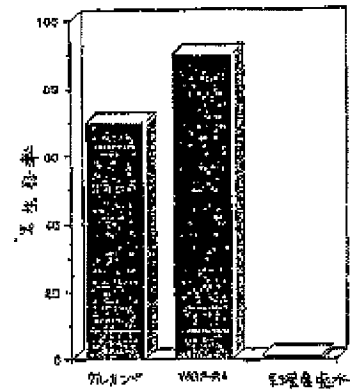


図 13

補正書の写し（顔紙文）提出書（特許請求の範囲の8）

平成4年3月8日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US90/05022

2. 発明の名称

免疫系活性化方法

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01605
ウォルセスター、プランテーション ストリート
878 トゥー バイオテクノロジー パーク

名称 アルファ ベータ テクノロジー、インコーポレイ、
ティッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪市中央区南町2丁目8番1号
大手納M2ビル 加田国際特許事務所
電話 06-810-6733(代)

氏名 井田士（1583） 加田 芳徳

5. 補正書の提出年月日

1991年11月12日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し（顔紙文）

1通

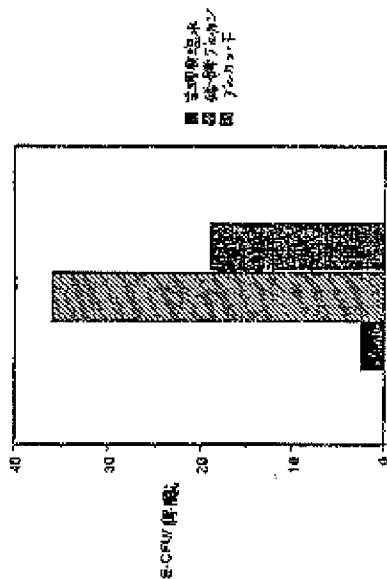


図 14

り、薬物学的に評価される固体、並びに β -グルカンが哺乳類の成細胞活性の増加を誘出できるように、天然の β -グルカンと比較して青芝に $(1-3)$ 成分が添加され、 β -グルカン受容体の親和力が増強されている修飾(modified) β - $(1-3)$ グルカンからなる、薬物の依拠性のある哺乳類の

13 準如 (modified) β -グルカンが酵母に由来するものである種々の糖類容うへり頂のいずれか配糖の組成物。

1. 3. 添例 (modified) g-ゲルカンが酵母に由来するもの

區 縣 報 告

[illegible]

Form 100-1 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

THE APPLICANT'S DECLARATION TO BE FILED WITH THE PATENT OFFICE	
Category	Item
X	Patent Abstracts of Japan, vol. 4, no. 123 (10-21), 13 August 1989, p. 55, 1, 5571701 (SAKURA CO. LTD.) 30 May 1980 See abstract
X	Vestnik Federal'nogo Nauchno-Issledovatel'skogo Tsentra Pro Vynalazeniya, no. 10, 13 October 1989, page 121 4 CS 8031-878 IL. HASLER et al. See abstract
X	Vestnik Federal'nogo Nauchno-Issledovatel'skogo Tsentra Pro Vynalazeniya, no. 11, 14 November 1989, pages 122-123 5 CS 3944-889 IL. HASLER et al. 1 CS 3945-880 IL. SAKURA et al. See abstract

Form 100-1 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

Form 100-2 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

FURTHER INFORMATION OBTAINED FROM THE SEARCH REPORT	
<p>1. The search report contains the following information:</p> <p>(a) The search report contains the following information:</p> <p>(b) The search report contains the following information:</p> <p>(c) The search report contains the following information:</p> <p>(d) The search report contains the following information:</p> <p>(e) The search report contains the following information:</p> <p>(f) The search report contains the following information:</p> <p>(g) The search report contains the following information:</p> <p>(h) The search report contains the following information:</p> <p>(i) The search report contains the following information:</p> <p>(j) The search report contains the following information:</p> <p>(k) The search report contains the following information:</p> <p>(l) The search report contains the following information:</p> <p>(m) The search report contains the following information:</p> <p>(n) The search report contains the following information:</p> <p>(o) The search report contains the following information:</p> <p>(p) The search report contains the following information:</p> <p>(q) The search report contains the following information:</p> <p>(r) The search report contains the following information:</p> <p>(s) The search report contains the following information:</p> <p>(t) The search report contains the following information:</p> <p>(u) The search report contains the following information:</p> <p>(v) The search report contains the following information:</p> <p>(w) The search report contains the following information:</p> <p>(x) The search report contains the following information:</p> <p>(y) The search report contains the following information:</p> <p>(z) The search report contains the following information:</p>	

Form 100-2 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

Form 100-3 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

FURTHER INFORMATION OBTAINED FROM THE SEARCH REPORT	
<p>On 13 December 1980, a declaration was sent to the applicant, stating that no search report would be issued, according to Article 17.1(a)(1) PCF, in compliance with Rule 39.1(a) PCF, according to Article 8 PCF, "The claim or claims shall define the subject for which protection is sought. Claims shall be clear and concise. They shall be fully supported by the description."</p> <p>Nevertheless, the decision was taken to make an exception in this case, and to issue a search report.</p> <p>An agreement with the applicant's representative, a search was performed for claim 1 as if it were modified to read:</p> <p>"A modified beta-glucan for stimulating an immune response in an individual."</p> <p>A term like "a modified beta-glucan" is neither clear nor concise. Therefore, the search had to be restricted for economic reasons.</p>	

Form 100-3 (Rev. 10-1-60) PCF/US 90/05022

第1頁の続き

④発明者 イーソン、デイー、デイビッド
ソン、ジュニア、

④発明者 オストロフ、ゲイリー アー
ル、

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01545 シェルズベリー、ハリ
ントン ファームズ 34

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01605 ウォルセスター、
株 2、ブランデーショーン ストリート 327